

根虫瘟霉原始菌株及转寄主菌株在不同培养条件下胞外蛋白酶的诱导表达特性

邓米霞, 徐均焕*

(浙江大学微生物研究所 杭州 310058)

摘要:通过比较根虫瘟霉 *Zoophthora radicans* 3 个菌株(原始菌株 R_0 、转寄主菌株 R_1 和 R_5)在不同培养条件下诱导胞外蛋白酶的差异,发现在含昆虫表皮和明胶的培养基中,均能诱导表达高水平的胞外蛋白酶,而在营养缺乏的 MS 培养基和营养丰富的萨氏培养基中则胞外蛋白酶的表达水平均很低。37 kD 的丝氨酸蛋白酶在任何条件下都能被诱导表达,是各菌株中的保守序列所编码的胞外蛋白酶。46 kD 的金属蛋白酶仅能在含明胶的培养基中被诱导表达,而葡萄糖可抑制其表达。在萨氏培养基中,67 kD 的蛋白酶条带在转寄主过程中消失了,而 46 kD 的金属蛋白酶条带和 117 kD 的条带随着转寄主传代数增加而明显,表明菌株在转染过程中选择表达了对新寄主具有较高基质特异性的胞外蛋白酶。

关键词:根虫瘟霉; 转寄主传代; 胞外蛋白酶; 基质特异性; 诱导表达

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)06-0924-06

Characteristics of inducible extracellular proteases expressed by *Zoophthora radicans* original and host-adapted strains under different culture conditions

DENG Mi-Xia, XU Jun-Huan* (Institute of Microbiology, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: A high level of protease activities were expressed both by *Zoophthora radicans* original strain (R_0) and host-adapted strains (R_1 and R_5) when they grew in MS medium containing insect cuticle or gelatin. On the contrary, very low level of protease activities were detected in extremely poor nutrient medium (MS) or rich nutrient medium (Sabouraud's dextrose broth, SDB). A 37 kD band belonging to serine protease was found to be induced in any cultural condition, suggesting it is a conservative sequence coding protease for three strains. On the other hand, a 46 kD band belonging to metalloprotease was expressed only in MS medium containing gelatin; however, its expression could be inhibited by MS medium containing glucose. Interestingly, a protease band with molecular weight of 67 kD disappeared, whereas the bands of 46 kD and 117 kD became more obvious for isolates after several infection cycles through *Plutella xylostella* when isolates grew in SDB medium. The results indicated that inducible high substrate-specific extracellular protease was greatly expressed to adapt to new host during passages of subculture through *P. xylostella*.

Key words: *Zoophthora radicans*; passages of reisolate; extracellular proteases; substrate-specific proteases; inducible expression

根虫瘟霉 *Zoophthora radicans*(虫霉目:虫霉科)是一类寄主范围较广的昆虫病原真菌,在自然条件下可侵染鞘翅目、鳞翅目、双翅目、同翅目和膜翅目等类群的昆虫,在害虫的微生物防治中发挥着重要

作用(冯明光和李增智, 1995)。与其他昆虫病原真菌相似,根虫瘟霉对寄主的入侵主要通过附着胞的机械压力和酶降解的共同作用来实现的(St Leger *et al.*, 1988, 1994; Charnley and St Leger, 1991)。其中

基金项目:国家自然科学基金项目(30470063);教育部及浙江省留学归国科研启动基金

作者简介:邓米霞,女,1982年生,硕士,从事昆虫病理及微生物分子生物学研究,E-mail:elize429@163.com

* 通讯作者 Author for correspondences, Tel.: 0571-88206199; E-mail: xujh@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2006-06-06; 接受日期 Accepted: 2006-09-26

胞外蛋白酶在穿透昆虫体壁,感染并致死寄主过程中发挥着尤为重要的作用,被认为是昆虫致病过程中的一个重要毒力因子,这是因为:第一,蛋白质是昆虫体壁的主要结构成分,占体壁成分的70%以上(Andersen *et al.*, 1995),而胞外蛋白酶在降解昆虫体壁过程中起着非常重要的作用(St Leger *et al.*, 1988; Bidochka and Khachatourians, 1994; Khachatourians, 1996);第二,胞外蛋白酶还能降解寄主体内抗真菌物质,减弱寄主的免疫响应(Vilcinskas and Götz, 1999);第三,胞外蛋白酶还能起到一种毒素的作用,可减弱昆虫血细胞对昆虫病原真菌的吞噬和吸附能力(Griesch and Vilcinskas, 1998; Ligoxygakis *et al.*, 2002)。

已有研究表明,胞外蛋白酶具有高度的基质特异性,它们对昆虫体壁的不同蛋白常表现为不同的亲和力(St Leger *et al.*, 1997)。病原真菌只有分泌出与寄主体壁蛋白具有很高基质特异性的胞外蛋白酶,才表现出对寄主很强的毒力及致病性。因此,胞外蛋白酶水平在一定程度上能反映菌株的侵染力,但有时不完全与毒力相关(Bidochka and Khachatourians, 1990; 冯明光, 1998)。这是因为基质特异性胞外蛋白酶常受底物的诱导调控(盛亮和徐均煥 2004),但目前对其诱导过程及机理还不十分清楚。本研究将通过对根虫瘟霉原始菌株以及转寄主菌株在不同培养基质及培养过程中胞外蛋白酶活性和电泳酶谱的变化分析,结合采用不同蛋白酶抑制剂对相关胞外蛋白酶类型的鉴定,证实了根虫瘟霉菌株拥有丰富的胞外蛋白酶类型,并能根据外界不同底物对蛋白酶系采取选择性表达的机制。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

根虫瘟霉菌株 ARSEF 1342(源自大菜粉蝶 *Pieris brassicae*)由美国农部植物保护研究所昆虫病原真菌收藏中心(Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, Plant Protection Research Unit, U. S. Plant, Soil & Nutrition Laboratory, Ithaca, New York)提供。供试菌株接种于牛奶蛋黄培养基(12%蛋黄、8%牛奶、1%蛋白胨、1%酵母粉、4%葡萄糖和1.5%琼脂)上,在4℃和光周期12L:12D下保存,每隔6个月转接一次。

以源于大菜粉蝶的 ARSEF1342 作为出发菌株 R_0 ,通过高剂量接种小菜蛾,从病死虫尸中分离获得

第1代转寄主菌株 R_1 。同样方法再用 R_1 高剂量接种小菜蛾,转接4次后获得第5代转寄主菌株 R_5 。

1.2 胞外蛋白酶活性测定

1.2.1 酶液制备:将供试菌株 R_0 、 R_1 和 R_5 分别在 SEMA 平板上于 20℃ 下培养,待菌落生长旺盛时将菌落挑碎后称取 200 mg 分别转入 30 mL 下列不同成分的液体培养基中培养:MS(0.31% KNO_3 、0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.05% KH_2PO_4 、0.05% K_2HPO_4)、MS + 2% 葡萄糖、MS + 2% 明胶、MS + 1% 小菜蛾昆虫表皮、萨氏培养基(1% 蛋白胨、1% 酵母粉和 4% 葡萄糖),培养至 5 天、10 天、15 天和 30 天取出,过滤菌丝,将酶液冷冻干燥浓缩 10 倍后置于 -20℃ 保存。

1.2.2 酶活性的测定:待测酶液中胞外蛋白酶的活性测定采用福林试剂法(林华峰等,1997)。取 0.2 mL 酶液与 0.4 mL 含有 0.5% 酪蛋白的蛋白酶活化缓冲液 [0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.0], 0.1% Triton X-100, 3 mmol/L $MgCl_2$] ,37℃ 水浴反应 30 min, 以 0.4 mL 0.4 mol/L 三氯乙酸终止反应。对照处理先加入三氯乙酸使酶失活。反应液离心后取上清液 0.5 mL 加入 2.5 mL Folin A 试剂静置 10 min, 最后加入 0.25 mL Folin B 试剂迅速摇匀后反应 30 min, 在 680 nm 下测定其光密度值。以每分钟催化分解酪蛋白生成 1 μg 酪氨酸的酶量作为一个酶活力单位(PU),对照标准曲线计算供试酶液的酶活力。

1.2.3 胞外蛋白酶表达差异条带分析:采用 In-Gel 蛋白酶分析技术比较胞外蛋白酶谱差异,该法较常规 SDS-PAGE 的优点是各胞外蛋白酶条带分离清楚。首先待测酶液在 10% SDS-PAGE(4℃)中上样,电泳分离后用 Western blotting 法转移到含有 0.1% 明胶的聚丙烯酰胺凝胶中。室温下在 2.5% 的 Triton X-100 中浸泡凝胶 20 min, 再置 37℃ 下在 pH 8.0 的蛋白酶活化缓冲液中孵育过夜。考马斯亮蓝染色,脱色观察蛋白酶条带。

1.2.4 表达差异的胞外蛋白酶类型的鉴定:采用不同的蛋白酶抑制剂(PMSF 抑制丝氨酸蛋白酶, EDTA 抑制金属蛋白酶)可鉴定表达差异的胞外蛋白酶类型。首先用上述不同蛋白酶抑制剂与酶液在 20℃ 下反应 20 min, 电泳、转胶、Triton X-100 处理,然后用 pH 8.0 的蛋白酶活化缓冲液孵育,染色脱色后观察蛋白酶条带抑制情况。

2 结果与分析

2.1 转寄主前后各菌株在不同培养条件下表达胞

外蛋白酶活力的差异(图 1)

原始菌株 R_0 以及转寄主菌株 R_1 、 R_5 在无有机碳氮源的 MS 培养基和营养丰富的萨氏培养基中产生的胞外蛋白酶活性水平普遍很低。但相对而言,在 MS 培养基中转寄主菌株 R_5 和 R_1 所产生的酶活性水平较原始菌株 R_0 高,而在萨氏培养基中多代转寄主菌株 R_5 表现更为明显,在培养后期所产生的酶活性水平大大高于菌株 R_0 和 R_1 ,至 30 天达最高峰。3 个菌株在富含氮源的 MS + 明胶以及 MS + 昆虫表皮培养基中产生的酶活性水平较高,在培养 10 天后即出现酶活性最高峰,以后又逐渐下降,表明明

胶及昆虫表皮等蛋白成分能诱导根虫瘟霉各菌株产生胞外蛋白酶,但对原始菌株 R_0 诱导作用强于转寄主菌株 R_5 和 R_1 。在富含碳源的 MS + 葡萄糖培养基中, R_0 和 R_1 表达的酶活性均呈现先下降后上升,再下降的趋势,其酶活性高峰在培养后 15 天出现,较富含氮源的培养基中推迟 5 天,这可能与碳源转化为氮源并进而诱导酶活性产生有关。而 R_5 表达的酶活性一直处于下降趋势,且酶活性水平很低,这正好与富含碳氮源的萨氏培养基中所表达的酶活性水平相反。

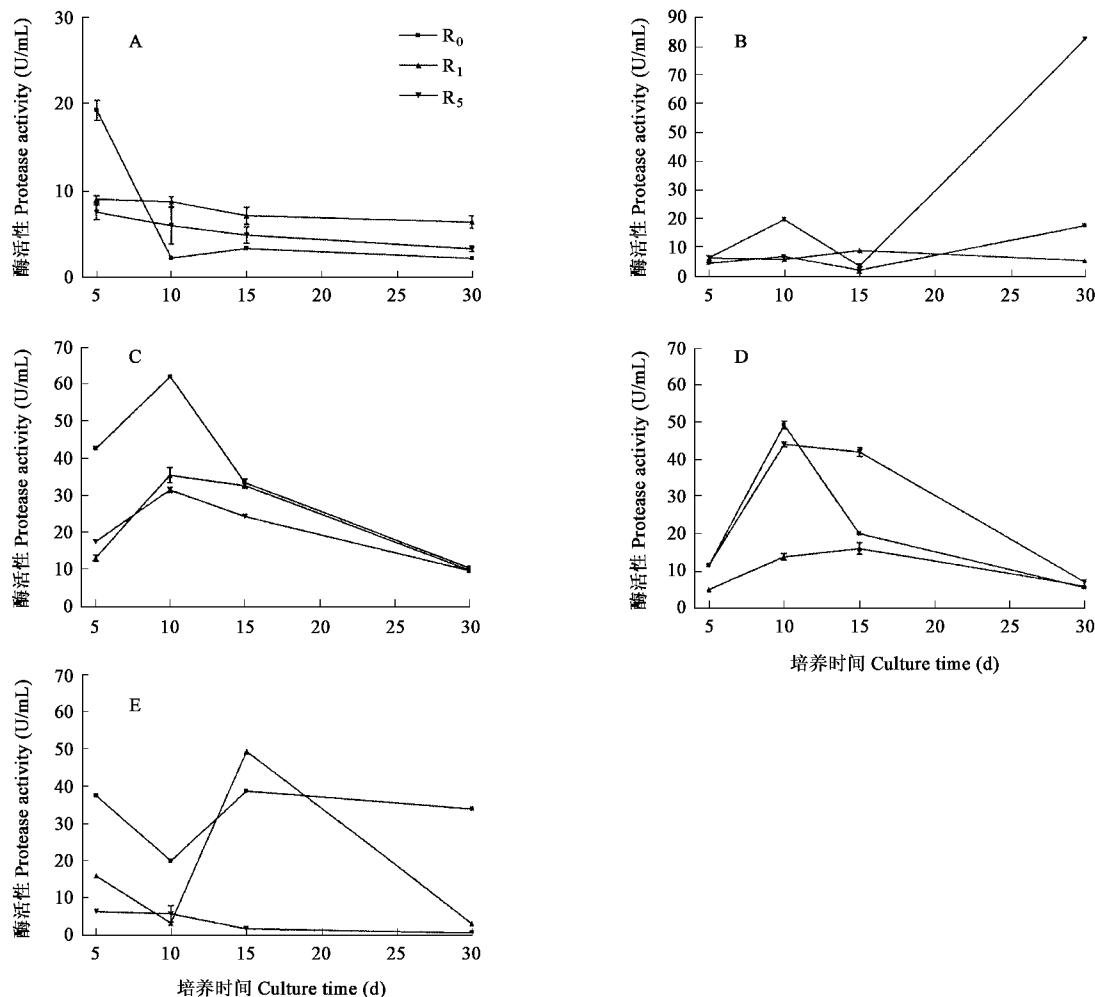


图 1 原始菌株(R_0)以及转寄主菌株(R_1 、 R_5)在不同成分培养基中表达的胞外蛋白酶活性

Fig. 1 Extracellular protease activities of the original strain (R_0) and the host-adapted strains (R_1 and R_5) under different culture conditions

A : MS ; B : 萨氏培养基 Sabouraud's dextrose broth ; C : MS + 昆虫表皮 MS + insect cuticle ; D : MS + 明胶 MS + gelatin ; E : MS + 葡萄糖 MS + glucose ; 图 2 同此 The same for Fig. 2.

2.2 转寄主前后各菌株在不同培养条件下胞外蛋白酶酶谱的比较

采用 In-Gel 蛋白酶分析技术对胞外蛋白酶谱差异比较表明(图 2),原始菌株 R_0 及转寄主菌株 R_1 、 R_5 在所有液体培养基中都能表达 37 kD 的条带。3 个菌株在 MS + 明胶和萨氏培养基中都能表达 46 kD 的条带,只是出现的时间有所不同,在萨氏培养基中

出现较晚(15~30 天),而在 MS + 明胶中第 10 天就出现了。有趣的是菌株 R_0 和 R_1 在 MS + 明胶和萨氏培养基中能表达分子量为 67 kD 的条带,而菌株 R_5 则没有表达该蛋白条带;相反在萨氏培养基中,菌株 R_0 和 R_1 只是低水平表达分子量为 117 kD 的条带,而菌株 R_5 中该条带的表达非常强。

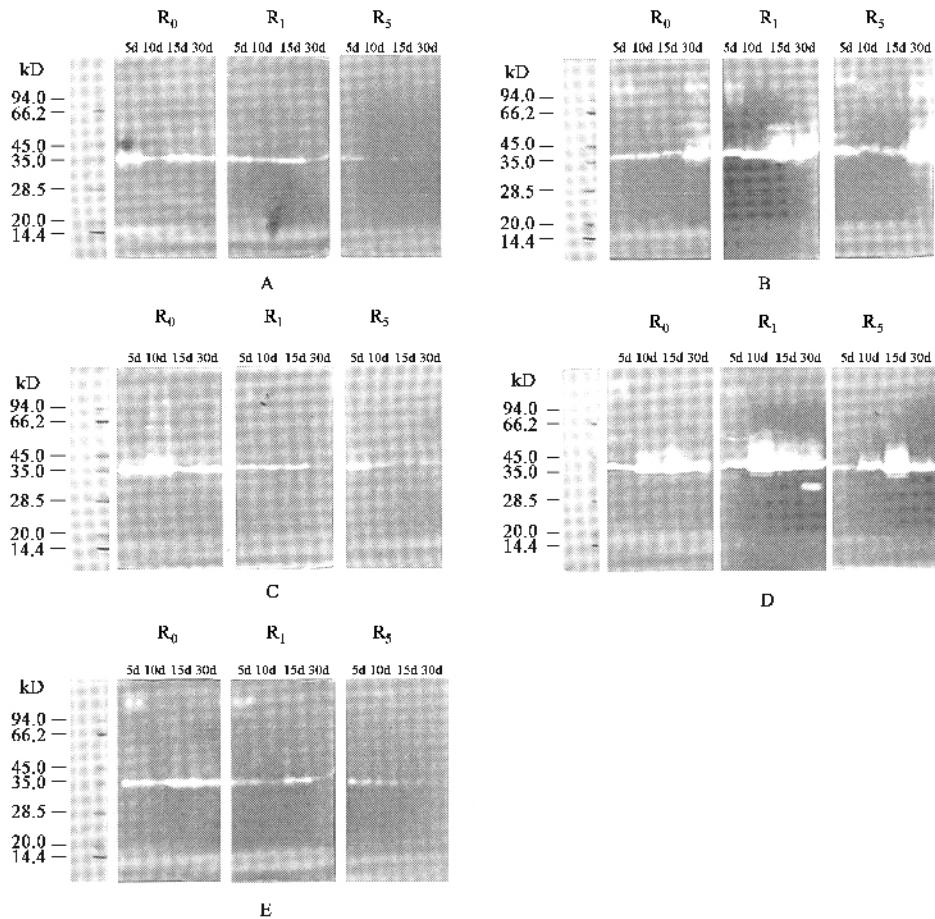


图 2 原始菌株(R_0)以及转寄主菌株(R_1 、 R_5)在不同成分培养基中表达的胞外蛋白酶电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis patterns of the extracellular proteases expressed by the original strain (R_0) and the host-adapted strains (R_1 and R_5) under different culture conditions

2.3 利用蛋白酶抑制剂鉴定胞外蛋白酶类型

因转寄主菌株 R_1 在 MS + 明胶和萨氏培养基中表达的蛋白酶类型丰富,基本包含了各菌株在不同培养条件下的蛋白酶类型。因此本研究选取该菌株在 MS + 明胶和萨氏培养基中表达的蛋白酶酶谱为对照(图 3:A),分别加入各蛋白酶抑制剂进行胞外蛋白酶类型分析。加入 PMSF 抑制后发现 37 kD 的条带明显减弱甚至消失,而 46 kD 的条带仍清晰(图 3:B),表明分子量为 37 kD 的胞外蛋白酶属丝氨酸蛋白酶。而加入 EDTA 抑制后发现 46 kD 的条带完全消失,而 37 kD 的条带仍清晰(图 3:C),表明分子

量为 46 kD 的胞外蛋白酶属金属蛋白酶。

3 讨论

由于大多数胞外蛋白酶是诱导酶,因此外源生长基质对胞外蛋白酶的产生有很大的影响,目前在球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 和金龟子绿僵菌 *Metarrhizium anisopliae* 等丝孢类昆虫病原真菌中已有很多相关报道,而在虫霉中有关胞外蛋白酶的报道甚少(Joshi, 1997, 1999)。本研究中,作者发现昆虫表皮和明胶能高水平诱导胞外蛋白酶的产生,表明

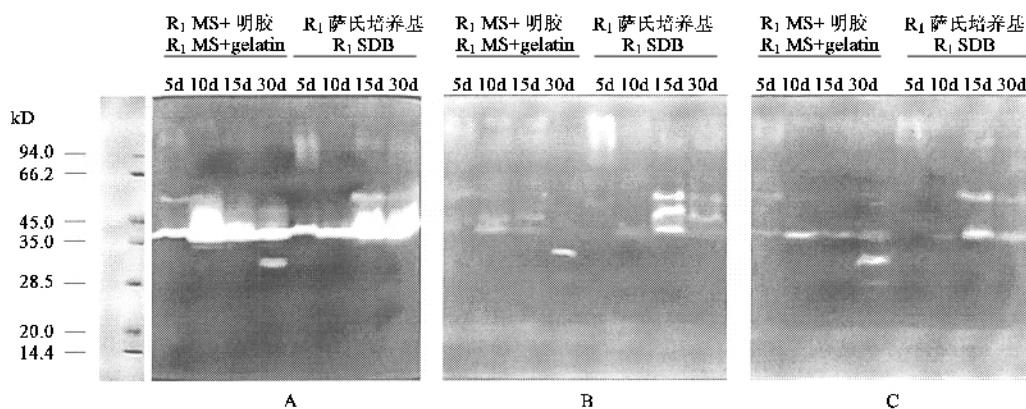


图 3 加抑制剂前后 转寄主菌株(R_1)在 MS + 明胶和萨氏培养基中表达的胞外蛋白酶电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis patterns of the extracellular proteases expressed by the host-adapted strains (R_1) under the MS media supplemented with gelatin and SDB by using protease inhibitors

A: 未加抑制剂 No protease inhibitor; B: 加丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF Serine-protease inhibitor PMSF; C: 加金属蛋白酶抑制剂 EDTA Metalloprotease inhibitor EDTA.

根虫瘟霉胞外蛋白酶易受外源蛋白的诱导。而在营养丰富的萨氏培养基中,培养 5~15 天时根虫瘟霉表达的胞外蛋白酶活性水平很低,表明当环境中易用物过于富余时,反而会促进菌丝徒长,菌丝也不会浪费能量去合成暂不需要的酶类。

比较蛋白酶电泳图谱发现,3 个菌株在不同的培养条件下均能产生 37 kD 条带,表明 37 kD 的丝氨酸蛋白酶可能是根虫瘟霉各菌株中的保守序列所编码的胞外蛋白酶。而只有在含明胶的培养基中才能产生 46 kD 的金属蛋白酶条带,而在 MS + 葡萄糖培养基上则不能诱导金属蛋白酶的产生,而且在含葡萄糖的萨氏培养基上,金属蛋白酶条带出现的时间也明显滞后,证明明胶对金属蛋白酶有明显的诱导作用,而葡萄糖则对金属蛋白酶的产生具有抑制作用。

比较原始菌株 R_0 以及转寄主菌株 R_1 、 R_5 在萨氏培养基中的电泳图谱发现,67 kD 的蛋白酶条带在转寄主过程中消失了,而 117 kD 的条带和 46 kD 的金属蛋白酶条带随着转寄主传代数增加而明显。特别当培养到 30 天时, R_5 表达的 117 kD 蛋白酶条带非常亮,而且总酶活性也非常高。表明菌株在适应新寄主过程中,可能抑制了对新寄主并不重要的蛋白酶基因的转录,而增加了具有寄主基质特异性的蛋白酶的表达。这一结果与李娟等(2004)报道的 R_0 在对新寄主的转染过程中逐渐增强了对寄主的侵染力的结论一致。

本研究比较了根虫瘟霉原始菌株 R_0 以及转寄

主菌株 R_1 、 R_5 在不同培养条件下胞外蛋白酶表达的差异,为了解根虫瘟霉的生物多样性、实现虫霉菌种基因改良、培养高毒力菌株提供了重要参考依据。

参 考 文 献 (References)

Andersen SO, Højrup P, Roepstorff P, 1995. Insect cuticular proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25: 153~176.

Bidochka MJ, Khachatourians GG, 1990. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invertebr. Pathol.*, 56: 362~370.

Bidochka MJ, Khachatourians GG, 1994. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. *J. Invertebr. Pathol.*, 64: 26~32.

Charnley AK, St Leger RJ, 1991. The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: Cole GT, Hoch HC eds. *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. New York: Plenum Press. 267~286.

Feng MG, 1998. Reliability of extracellular protease and lipase activities of *Beauveria bassiana* isolates used as their virulence indices. *Acta Microbiologica Sinica*, 38: 461~467. [冯明光, 1998. 胞外蛋白酶和酯酶活性作为球孢白僵菌毒力指标的可靠性分析. *微生物学报*, 38: 461~467]

Feng MG, Li ZZ, 1995. Entomophora and its utilization. In: Chen T ed. *Microbial Control of Pest Organisms: Principles and Technology*. Wuhan: Hubei Science and Technology Publishing House. 273~291. [冯明光, 李增智, 1995. 虫霉菌及其利用. 见:陈涛主编. 有害生物的微生物防治原理和技术. 武汉:湖北科学技术出版社. 273~291]

Griesch J, Vilcinskas A, 1998. Proteases released by entomopathogenic fungi impair phagocytic activity, attachment and spreading of plasmacytoid dendritic cells isolated from haemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*.

Biocontrol Sci. Technol., 8: 517-531.

Joshi L, St Leger RJ, 1999. Cloning, expression, and substrate specificity of MeCPA, a zinc carboxypeptidase that is secreted into infected tissues by the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *J. Biol. Chem.*, 274: 9 803-9 811.

Joshi L, St Leger RJ, Roberts DW, 1997. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (PrlB) from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display-RT-PCR. *Gene*, 197: 1-8.

Khachatourians GG, 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In: Miller JD ed. *The Mycota VI*. Berlin: Springer-Verlag. 331-363.

Li J, Xu JH, Feng MG, 2004. Infectivity of a *Pieris brassicae*-derived *Zoophthora radicans* isolate and its new host-passage isolates against *Plutella xylostella* in relation to the phenoloxidase activity in the new host hemolymph after infection. *Acta Entomologica Sinica*, 47(5):567-572. [李娟, 徐均焕, 冯明光, 2004. 大菜粉蝶根虫瘟霉菌株转染小菜蛾后侵染力变化及其与寄主血淋巴酚氧化酶活性的关系. *昆虫学报*, 47(5):567-572.]

Ligoxygakis P, Pelte N, Hoffmann JA, Reichhart JM, 2002. Activation of *Drosophila* toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science*, 297: 114-116.

Lin HF, Li LD, Li ZZ, Fan MZ, 1997. Testing extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and the relationship between protease and esterase type of the strains. *Chin. J. Biol. Contr.*, 13: 32-36. [林华峰, 李连德, 李增智, 樊美珍, 1997. 白僵菌胞外蛋白酶的测定及其与酯酶型的关系. *中国生物防治*, 13: 32-36.]

Sheng L, Xu JH, 2004. The expression of extracellular protease associated with *Zoophthora radicans* virulence induced by *Plutella xylostella*. *Mycosistema*, 23(2): 226-232. [盛亮, 徐均焕, 2004. 根虫瘟霉转寄主过程中毒力相关胞外蛋白酶系的诱导表达. *菌物系统*, 23(2): 226-232.]

St Leger RJ, Durrands PK, Cooper RM, Chamley AK, 1988. Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Microbiol.*, 150: 413-416.

St Leger RJ, Bidochka MJ, Roberts DW, 1994. Isoforms of the cuticle-degrading Prl proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 313: 1-7.

St Leger RJ, Joshi L, Roberts DW, 1997. Adaptation of proteases and carboxydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to requirements of their ecological niches. *Microbiology*, 143: 1 983-1 992.

Vilcinskas A, Götz P, 1999. Entomopathogenic fungi and the insect immune system. In: Baker JR, Muller R, Rollinson D eds. *Advances in Parasitology* Vol. 43. London: Academic Press. 280-299.

(责任编辑:黄玲巧)